

FOLLETO DE LABORATORIO

LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA
(IB-3603)
II SEMESTRE, 2025

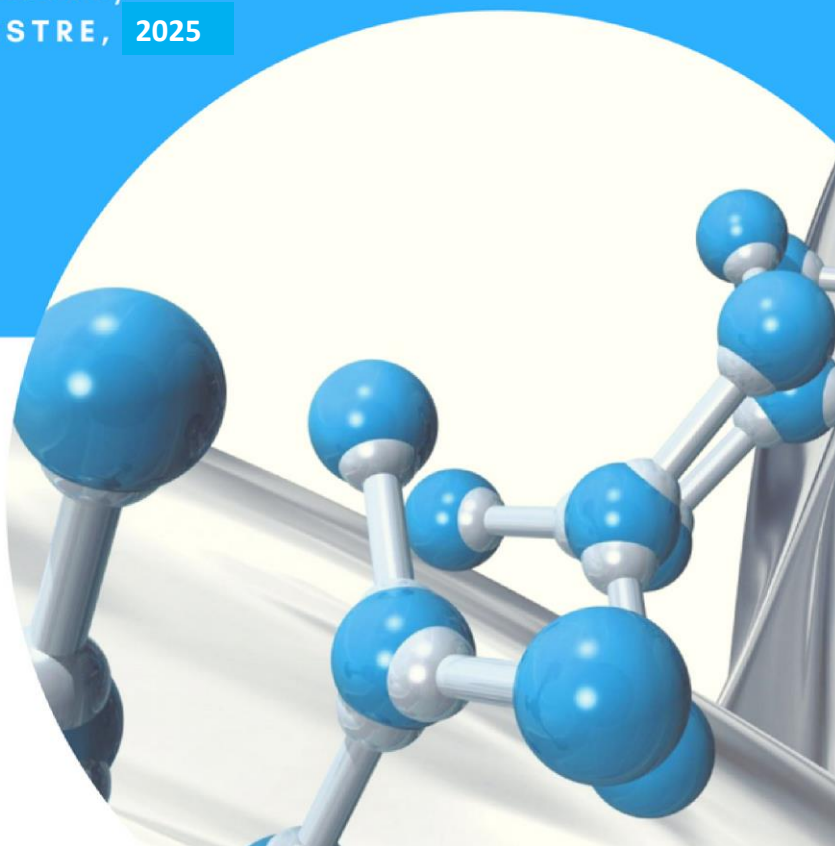


TABLA DE CONTENIDO

NORMAS DE SEGURIDAD DENTRO DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.....	2
PRÁCTICA 1 CARÁCTER ANFÓTERO Y TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS	4
PRÁCTICA 2 MÉTODOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS AMINOÁCIDOS	7
PRÁCTICA 3 TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	12
PRÁCTICA 4 DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS	16
PRÁCTICA 5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA AMILASA	21
PRÁCTICA 6 PROPIEDADES DE LOS CARBOHIDRATOS	25
PRÁCTICA 7 HIDRÓLISIS QUÍMICA DE CARBOHIDRATOS	30
PRÁCTICA 8 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	33
PRÁCTICA 9 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS LÍPIDOS	36
PRÁCTICA 10 EXTRACCIÓN DE CEFALINA Y LECITINA.....	39
PRÁCTICA 11 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	42

NORMAS DE SEGURIDAD DENTRO DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

Las normas de seguridad están diseñadas para garantizar un ambiente de trabajo seguro y profesional en el laboratorio de bioquímica. Cumplir con estas normas es responsabilidad de cada estudiante y del profesor encargado.

1. Normas Generales

- a. Solo los estudiantes matriculados, el profesor asignado, el técnico de laboratorio y personal autorizado pueden ingresar al laboratorio.
- b. Los experimentos deben realizarse bajo la supervisión del profesor.
- c. Procure llegar siempre a tiempo a las sesiones de laboratorio. La entrada tardía puede interferir con las instrucciones iniciales y procedimientos importantes.
- d. Mantenga un comportamiento profesional y respetuoso en todo momento.
- e. Mantenga los teléfonos celulares en modo silencioso y úselos solo para actividades relacionadas con el laboratorio, si es necesario.
- f. Mantenga la bitácora de acuerdo con los lineamientos indicados en el programa del curso. Incluya además todas las observaciones, datos y modificaciones al procedimiento realizados.
- g. Prohibido correr dentro del laboratorio para evitar accidentes.
- h. Informe inmediatamente a su profesor sobre cualquier problema, duda o situación irregular que observe.
- i. Si va a grabar o tomar fotografías, pídale permiso al profesor.

2. Equipo de Protección Personal (EPP)

- a. Use la gabacha del laboratorio en todo momento para proteger su ropa y piel. Sin gabacha, no puede ingresar al laboratorio. Asegúrese de vestirla apropiadamente (cerrada).
- b. Cuando la práctica así lo requiera, proteja sus ojos con anteojos de seguridad.
- c. Use guantes cuando manipule sustancias químicas, muestras biológicas o equipos potencialmente peligrosos. Recuerde que esta información debe venir detallada en la bitácora previamente a la realización de la práctica.
- d. Use zapatos cerrados para proteger los pies de derrames y objetos afilados.
- e. Amárrese el pelo si lo tiene largo.

3. Conducta en el Laboratorio

- a. No se permite consumir alimentos o bebidas en el laboratorio. Si ocupa tomar agua, pida autorización al profesor para salir y tomar agua.
- b. Mantenga el área de trabajo limpia y ordenada. Deseche los residuos en los contenedores apropiados o en la pila, según corresponda.
- c. Etiquete claramente todas las soluciones, muestras y reactivos que utilice.
- d. Evite trabajar solo en el laboratorio; siempre debe haber al menos otra persona presente.

4. Manejo de Sustancias Químicas y Muestras Biológicas

- a. Revise las Fichas de Datos de Seguridad de todos los reactivos y productos químicos antes de utilizarlos.
- b. Si es necesario, transporte las sustancias químicas y muestras biológicas con cuidado, utilizando bandejas o contenedores adecuados.
- c. Informe inmediatamente cualquier derrame o accidente al profesor para tomar las medidas de limpieza o emergencia si corresponde.
- d. Ubique la ducha y el baño de ojos y aprenda a utilizarlos desde la primera práctica.
- e. Recuerde que la información relacionada a la peligrosidad y apropiado descarte de las sustancias a utilizar debe venir detallada en la bitácora previamente a la realización de la práctica.

5. Uso de Equipos y otro material

- a. No utilice ningún equipo o material (micropipetas) sin haber recibido instrucciones adecuadas sobre su uso. Si tiene alguna duda, consulte nuevamente al profesor o al técnico de laboratorio.
- b. Asegúrese de que los equipos estén calibrados y en buen estado antes de usarlos.
- c. Apague y desconecte los equipos cuando no los esté utilizando.

6. Residuos y Desechos

- a. Separe los residuos químicos, biológicos y comunes según las normas del laboratorio.
- b. Utilice los contenedores apropiados para cada tipo de residuo.
- c. Siga las instrucciones del profesor para la disposición final de residuos peligrosos.
- d. Recuerde que la información relacionada a la peligrosidad y apropiado descarte de las sustancias a utilizar debe venir detallada en la bitácora previamente a la realización de la práctica.

PRÁCTICA 1

CARACTER ANFÓTERO Y TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS

OBJETIVO

Mostrar el carácter anfótero de los aminoácidos mediante su titulación

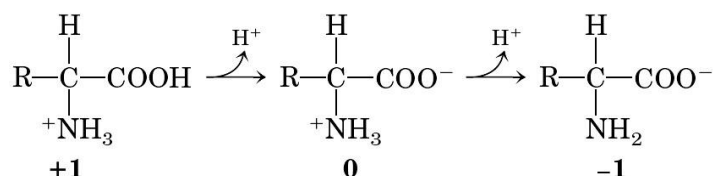
Los aminoácidos se definen como compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxílico ($-COOH$). Estos se pueden clasificar en alfa (α), beta (β) y gamma (γ) aminoácidos según la posición del grupo amino. Los alfa aminoácidos constituyen bloques o monómeros que, al unirse por medio de enlaces peptídicos, se combinan para formar péptidos (menos de 50 aminoácidos) o proteínas (más de 50 aminoácidos).

A nivel estructural, los aminoácidos presentan una estructura básica común, en que un átomo de carbono central está unido a un grupo radical, un grupo amino (de carácter básico) y un grupo carboxilo (de carácter ácido).

El grupo amino y el grupo carboxilo permiten a los aminoácidos comportarse en solución acuosa como ácidos débiles o como bases débiles según su estado de ionización y, por esta razón, se dice que son **anfóteros** (sustancias que pueden comportarse como ácido o como base). La carga de estos dos grupos varía según el pH de la solución en que se encuentre; a pH bajos el grupo amino se encuentra protonado y cargado positivamente mientras que el carboxilo se encuentra sin carga, y a pH altos el amino está sin carga y el carboxilo tiene carga negativa.

En la forma **zwitterión** (ión dipolar), el grupo carboxilato ($RCOO^-$) ha perdido un protón y se encuentra cargado negativamente y el grupo amino ha captado un protón y está cargado positivamente. Esta forma es la que predomina a pH neutro y es la que se utiliza para representar a los aminoácidos. Los valores de pH donde se dan estos cambios en las moléculas de aminoácidos se denominan pK_a .

Los ácidos monoamino monocarboxílicos presentan valores extremos de pK_a (entre 2 y 9) y actúan como amortiguadores en dos regiones de pH. En la titulación de un aminoácido se puede observar este comportamiento. El **punto isoelectrico** (valor de pH donde la molécula tiene carga neta 0) puede calcularse dividiendo la suma de los dos valores de pK_a entre dos. Esta propiedad de los aminoácidos, que a su vez forman proteínas, explica su acción amortiguadora en la sangre y otros fluidos biológicos.



Existen siete aminoácidos que poseen cadenas radicales cuyas cargas también varían con el pH de la solución en que se encuentren; estos cambios también afectan la carga final de la molécula.

La presente práctica tiene como objetivo que el estudiante se familiarice con el carácter anfótero de los aminoácidos mediante su titulación. Se le asignará un aminoácido incógnito, el cual tendrá que analizar para determinar su identidad aplicando las técnicas aprendidas.

MATERIALES	REACTIVOS
pHmetro	Solución 100 mM de NaOH
1 Beaker de 100mL ó Erlenmeyer de 100 ml	Solución 20 mM de Lisina a pH 1.5
1 Bureta de 50 ml	Solución 20 mM de Histidina a pH 1.5
1 Pipeta de 25 ml	Solución 20 mM de Arginina a pH 1.5
1 Pipeteador o pera	Solución 20 mM de Glicina a pH 1.5
Recipiente para descarte de reactivos	Solución 20 mM de Glutamina a pH 1.5
	Solución incógnita de aminoácidos 20 mM a pH 1.5

PROCEDIMIENTO

1. En un beaker de 100 ml, pipetear 20 ml de solución de aminoácido 20 mM, la cual está a un pH de 1.5.
2. Usando una bureta, agregue poco a poco NaOH 100 mM en cantidades de 0,5 ml. Después de cada adición agite la solución, mida el pH correspondiente y anote el volumen de la base que se ha consumido en un cuadro.
3. Continúe este procedimiento hasta que llegue a un pH de 12.
4. Repita el procedimiento para titular el aminoácido incógnito que se le asignó.

5. Anote los resultados para cada aminoácido y construya una curva de ml de NaOH vs pH para cada uno de los aminoácidos analizados.
6. Compare los resultados con lo reportado en la literatura y determine la identidad del aminoácido incógnito asignado.

BIBLIOGRAFÍA

Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina. Manual de Laboratorio de Bioquímica para Microbiología. Universidad de Costa Rica. 2009.

Quesada Silvia. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007.

Nelson D. L. y M. M. Cox. Lehninger: Principles of Biochemistry. 4° Ed. W. H. Freeman. 2004.

Cassidy M. Dobson, and Nathan S. Winter, "The Identification of Amino Acids by Interpretation of Titration Curves: An Undergraduate Experiment for Biochemistry." World Journal of Chemical Education, vol. 2, no. 4 (2014): 59-61. doi: 10.12691/wjce-2-4-3.

PRÁCTICA 2

MÉTODOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS AMINOÁCIDOS

OBJETIVO

Estudiar métodos físicos y químicos para caracterizar aminoácidos.

Las proteínas de todos los seres vivos están constituidas por los mismos veinte aminoácidos, que se diferencian entre ellos por el tamaño, la forma, carga y relatividad química de los grupos de su cadena radical, características que pueden llegar a determinar propiedades estructurales de las proteínas.

La presencia de algunos aminoácidos, en solución o formando parte de proteínas, se puede determinar cualitativamente mediante reacciones de los grupos de su cadena radical con otros reactivos que produzcan compuestos coloreados. Algunos ejemplos son:

Los grupos aromáticos, característicos del triptófano y la tirosina, que reaccionan con el ácido nítrico generando un producto amarillo. Esta reacción es conocida como reacción Xantoproteica, en la que se da la nitración del grupo aromático.

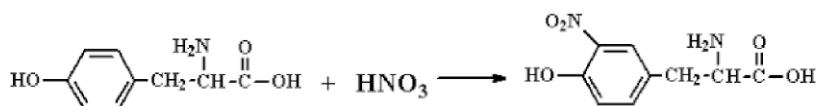


Figura 1: Reacción de nitración de la tirosina

Por otro lado, el grupo guanidino de la arginina en un medio alcalino reacciona con el alfa-naftol en presencia de un halógeno, como el cloro o el bromo (por ejemplo, con el hipoclorito de sodio) y produce un compuesto rojo. Esta reacción es conocida como reacción de Sakaguchi.

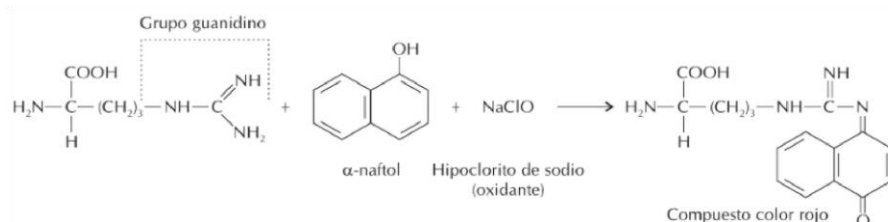


Figura 2: Reacción de Sakaguchi con la Arginina

Otra reacción clásica es la reacción de Ehrlich, que permite identificar grupos de anillos aromáticos fenólicos o nitrogenados de la cadena lateral de aminoácidos mediante la reacción entre el ácido sulfanílico y el nitrito de sodio, dando como producto sales de diazonio fuertemente coloreadas.

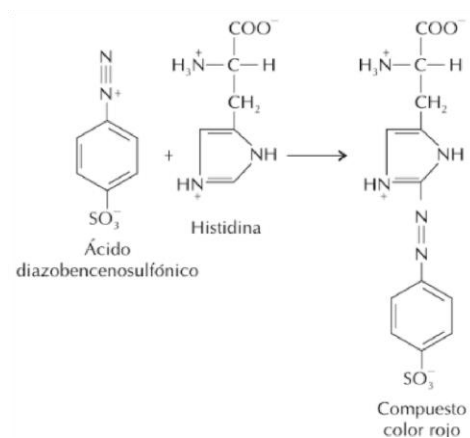


Figura 3: Reacción de Ehrlich con la histidina

Por último, la reacción de Hopkins-Cole se utiliza para la identificación del triptófano y de las proteínas que contienen este aminoácido. En presencia de ácido glioxílico y ácido sulfúrico concentrado se da la formación de un anillo color violeta-rojizo.

1. REACCIÓN DE SAKAGUCHI

MATERIALES

8 Tubos de ensayo
 Gradilla para tubos de ensayo
 Pipeta 1 ml y pipeteador
 ó Micropipeta de 1000 μL y puntas de micropipeta de 1000 μL
 4 Goteros

REACTIVOS

Solución 100 mM de Tirosina
 Solución 100 mM de Ácido glutámico
 Solución 100 mM de Lisina
 Solución 100 mM de Histidina
 Solución 100 mM de Arginina
 Solución de albúmina al 10% en solución salina*
 Solución de NaOH 2 N.
 Solución de alfa-naftol al 1% en etanol de 95
 Solución de hipoclorito de sodio al 1%
 Agua destilada

*Solución salina: 0,85% NaCl en H_2O_d

PROCEDIMIENTO

1. Rotule 8 tubos como Arginina, Histidina, Tirosina, Ácido glutámico, Lisina, Albúmina e incógnita.

2. Verter 0,5 ml de la solución respectiva en cada tubo de ensayo.

3. Agregue a cada tubo:

- 5 gotas de la solución de NaOH 2N.
- 5 gotas de la solución de alfa-naftol.
- 3 gotas de hipoclorito de sodio.

4. Mezclar bien y observar si ocurre un cambio de color.

5. Anotar los resultados observados para cada solución.

2. REACCIÓN DE EHRLICH

MATERIALES

8 Tubos de ensayo
Gradilla para tubos de ensayo
Pipeta 1 ml y pipeteador
ó Micropipeta de 1000 μ L y puntas de micropipeta de 1000 μ L
Goteros

REACTIVOS

Solución 100 mM de Tirosina
Solución 100 mM de Ácido glutámico
Solución 100 mM de Lisina
Solución 100 mM de Histidina
Solución 100 mM de Arginina
Solución de albúmina al 10% en solución salina
Solución de ácido sulfanílico al 0,5% en ácido clorhídrico al 2%
Solución de nitrito de sodio al 0,5% (recién preparada)
Solución de carbonato de sodio al 10%
Agua destilada

PROCEDIMIENTO

1. Rotule 8 tubos como Arginina, Histidina, Tirosina, Ácido glutámico, Lisina, Albúmina, control negativo e incógnita.
2. Verter en cada uno de los tubos 1 ml de solución de nitrito de sodio en un tubo de ensayo, agregar 1 ml de la solución de ácido sulfanílico y mezclar.
3. Dejar en reposo 1 minuto.
4. Agregar 1 ml de la respectiva solución en estudio y mezclar.

5. Alcalinizar el medio con 5 gotas de carbonato de sodio en todos los tubos.
6. Anotar los resultados obtenidos para cada solución.

3. REACCIÓN XANTOPROTEICA

MATERIALES	REACTIVOS
8 Tubos de ensayo	Solución 100 mM de Tirosina
Gradilla para tubos de ensayo	Solución 100 mM de Ácido glutámico
Pipeta 1 ml y pipeteador	Solución 100 mM de Lisina
ó Micropipeta de 1000 µL y puntas de	Solución 100 mM de Histidina
micropipeta de 1000 µL	Solución 100 mM de Arginina
Goteros	Solución de albúmina al 10% en solución salina.
	Solución de ácido nítrico concentrado.
	Solución de hidróxido de sodio al 2 N.
	Agua destilada

PROCEDIMIENTO

1. Rotule 8 tubos como Arginina, Histidina, Tirosina, Ácido glutámico, Lisina, Albúmina, incógnita y control negativo.
2. En cada tubo de ensayo vierta 4 gotas de la solución en estudio y 4 gotas de ácido nítrico concentrado.
3. Añada 4 gotas de NaOH 2 N para alcalinizar el medio.
4. Observe el cambio de color.

4. REACCIÓN DEL TRIPTÓFANO

MATERIALES	REACTIVOS
8 Tubos de ensayo	Solución 100 mM de Tirosina
Gradilla para tubos de ensayo	Solución 100 mM de Ácido glutámico
Pipeta 1 ml y pipeteador	Solución 100 mM de Lisina
ó Micropipeta de 1000 μ L y puntas de micropipeta de 1000 μ L	Solución 100 mM de Histidina
Goteros	Solución 100 mM de Arginina
	Solución de albúmina al 10% en solución salina.
	Solución de ácido acético concentrado.
	Solución de sulfúrico concentrado.

PREPARACIÓN

1. Rotule 8 tubos como Arginina, Histidina, Tirosina, Ácido glutámico, Lisina, Albúmina, control negativo e incógnita.
2. Añadir a cada tubo 1 ml de la respectiva solución de estudio
3. A cada tubo se le agregan 0,5 ml de ácido acético.
4. Agregar lentamente 0,5 ml de ácido sulfúrico por las paredes del tubo.
5. Observar cambios de color y anotar resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.
- Quesada Silvia. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007.

PRÁCTICA 3

TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

OBJETIVO

Estudiar métodos que permitan purificar proteínas a partir de una matriz compleja.

Cuando se quiere estudiar una proteína que se encuentre inmersa en una matriz, el primer paso es separarla de las demás sustancias del extracto. Para este fin se pueden utilizar varias técnicas y muchas de ellas se basan en la precipitación de las proteínas por la naturaleza del solvente. En soluciones acuosas, las proteínas forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Cuando se rompen estas uniones, las proteínas no se mantienen en suspensión y precipitan.

En algunos casos se utilizan soluciones saturadas de sales, ya que estos compuestos liberan a las moléculas de agua que están unidas a los puentes de hidrógeno, lo que hace que precipiten las proteínas. La sal más utilizada con este fin es el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En otras técnicas se utilizan ácidos o bases con el fin de alterar las cargas de las proteínas y las interacciones de los puentes de hidrógeno, para inducir así la precipitación de estos compuestos.

Adicionalmente, para la separación de proteínas por precipitación, también se utilizan cationes de metales o aniones de ácidos. Este método, generalmente se emplea cuando las proteínas no van a ser estudiadas y más bien son una interferencia en la muestra. Cuando una proteína se encuentra en su punto isoeléctrico, su carga es cero: si se encuentra por encima de ese pH los grupos cargados positivamente se desprotonan y la proteína adquiere carga negativa; y en el caso contrario, si el valor del pH está por debajo del punto isoeléctrico los grupos ionizables están protonados y la carga de la proteína es positiva. Si una proteína cargada negativamente reacciona con un catión o si una cargada positivamente reacciona con un anión, van a formar una sal insoluble que precipita.

1. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS POR ADICIÓN DE ANIONES Y CATIONES

MATERIALES	REACTIVOS
Tubos de ensayo	Solución de clara de huevo al 20% en solución salina.
Gradilla para tubos de ensayo	Hidróxido de sodio al 10%
Goteros	Ácido acético al 5%
Pipetas 5 ml	Cloruro férrico al 2%
	Sulfato cúprico al 2%

PROCEDIMIENTO

1. Rotule 4 tubos de ensayo de vidrio como (1) cloruro férrico + NaOH, (2) cloruro férrico + HAC, (3) sulfato cúprico + NaOH, (4) sulfato cúprico + HAC,
2. Añadir 2,5 ml de solución de clara de huevo a cada tubo.
3. A los tubos (1) y (3), agregue 1 gota de NaOH al 10%. Agite suavemente.
4. A los tubos (2) y (4), agregue 5 gotas de HAC al 5%. Agite suavemente.
5. A los tubos (1) y (2), agregue 10 gotas de cloruro férrico al 2%. Agite y observe.
6. A los tubos (3) y (4), agregue 10 gotas de sulfato cúprico al 2%. Agite y observe.

2. SEPARACIÓN DE ALBÚMINAS Y GLOBULINAS DE HUEVO POR PRECIPITACIÓN POR ADICIÓN DE SALES

MATERIALES

REACTIVOS

Tubos de centrifuga de 15 ó 50 ml	Solución de clara de huevo al 50% en solución salina
Gradilla para tubos de ensayo	Sulfato de amonio en cristales
Goteros	Solución saturada de sulfato de amonio a diferentes
Pipetas 5 ml	porcentajes
Espátula acanalada	
Centrífuga	

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en un tubo 2,5 ml de solución de clara de huevo y 2,5 ml de la solución saturada de sulfato de amonio.
2. Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.
3. Separar el sobrenadante.
4. Disolver el precipitado en 3 ml de solución salina (aislamiento de globulinas, rotule y guarde para el siguiente laboratorio a 4°C)
5. Añadirle al sobrenadante los cristales de sulfato de amonio hasta que se sature. Probar diferentes porcentajes de saturación

(Ver: <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>)

6. Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante.
8. Disolver el precipitado en 3 ml de solución salina (aislamiento de albúmina, rotule y guarde para el siguiente laboratorio a 4°C).

3. SEPARACIÓN DE CASEÍNA Y LACTALBUMINA POR PRECIPITACIÓN POR ÁCIDOS

MATERIALES	REACTIVOS
Papel para medir pH o pHmetro	Ácido acético 6 N
2 Beakers de 250 ml	Etanol
1 Probeta de 100 ml/ 50ml	NaOH al 10 %
2 Erlenmeyers de 500 ml	Éter etílico
1 Plato de Petri	Agua destilada
1 Embudo de filtración	
Pipetas de 5 ml	
Soporte y anillo	
Calentador eléctrico	
Papel filtro	

PROCEDIMIENTO

1. Medir 80 ml de leche en una probeta y transvasarlos a un beaker de 250 ml.
2. Diluir la leche con 80 ml de agua y añadir ácido acético 6 N hasta obtener un pH aproximado de 4.6.
3. Filtrar el precipitado de caseína y guardar el suero obtenido.
4. Lavar el precipitado con 60 ml de agua destilada.
5. Lavar el precipitado de caseína una vez con 10 ml de etanol y dos veces más con 10 ml de éter etílico (es muy inflamable).
6. Poner la caseína en un plato Petri y secarlo a temperatura ambiente (se obtiene aproximadamente 1 g de caseína).
7. Neutralice el suero filtrado de la caseína en el punto 3 con NaOH al 10% (lleve a pH neutro).

8. Agregue 3 ml de ácido acético 6N por cada 100 ml de leche usada y caliente con cuidado hasta que la albúmina se precipite completamente.
9. Recoja el precipitado en un papel de filtro cuantitativo tarado y pese la cantidad de lactalbúmina obtenida.
10. Calcule el porcentaje de recuperación de ambas proteínas.

Densidad de la leche: 1,03g/ml

Caseína: 26g/kg leche

BIBLIOGRAFÍA

- Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.
- Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina. Manual de Laboratorio de Bioquímica para Microbiología. Universidad de Costa Rica. 2009.
- Quesada Silvia. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007.
- Wingfield, P. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science*, A-3F.

PRÁCTICA 4

DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

OBJETIVOS

Identificar por medio de un método colorimétrico la presencia de proteínas y albúmina en una solución.

Determinar por un método espectrofotométrico la concentración de proteínas en una solución.

En la reacción de Biuret, los iones de cobre II en solución alcalina forman un complejo con los pares electrónicos libres de los nitrógenos de los grupos imino en el enlace peptídico. Esta reacción provoca la formación de un quelato color violeta, y es producida por los péptidos y las proteínas, pero no por los aminoácidos.

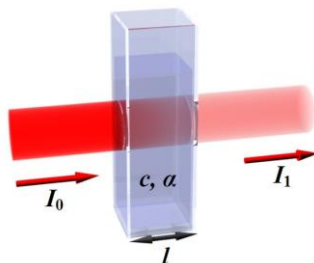
Para que se pueda dar esta reacción, se necesita que haya al menos dos uniones peptídicas. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de proteínas (enlaces) presentes en la muestra, por lo que el método permite la cuantificación de las muestras.

Algunas sustancias no proteicas pueden reaccionar con el reactivo de Biuret dando un resultado falso positivo, por lo que se necesita tener cuidado al interpretar esta prueba. Cuando la prueba es negativa (se conserva el color celeste) puede deberse a las siguientes razones:

- 1) No hay proteínas ni péptidos en la muestra, por lo que el resultado es negativo (tampoco hay sustancias no proteicas que reaccionen con el reactivo).
- 2) Existen una o más sustancias en la muestra que interfieren con la reacción, lo que generaría un falso negativo. Esto se evita conociendo previamente la naturaleza de la muestra; por ejemplo, si se está trabajando con péptidos obtenidos por hidrólisis ácida, se debe alcalinizar la muestra para que se dé la reacción.
- 3) La concentración de péptidos se encuentra por debajo del mínimo detectable, lo que provoca un falso negativo.

Considerando que la concentración de proteínas (enlaces peptídicos) es proporcional a intensidad de color obtenido en la reacción de Biuret, para medir esto se recurre a la espectrofotometría. Este método se basa en la propiedad que tienen varias sustancias de absorber la luz a una determinada longitud de onda (dentro del espectro visible o ultravioleta) y compara la intensidad de la luz antes y después de incidir en la sustancia a analizar. El cambio o diferencia que se observa entre ambas mediciones se reporta como absorbancia y ésta se puede utilizar para determinar la concentración de analito mediante la ley de Lamber- Beer.

$A = abc$	$a =$ coeficiente de absortividad molar
	$b =$ longitud (l en el gráfico)
	$c =$ concentración



Al calcular una relación matemática entre la absorbancia de un patrón conocido y la de la muestra a analizar es posible determinar la concentración de esta última.

La prueba de Verde de Bromocresol es específica para la determinación de albúmina. El reactivo se encuentra en un medio ácido, que provoca que se disocie y su forma aniónica se une de forma específica a la albúmina, con lo que se produce un cambio de color de amarillo a celeste o azul-verdoso. La intensidad del color es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

1. PRUEBA DE BIURET (CUALITATIVA)

MATERIALES

Tubos de ensayo
Gradilla para tubos de ensayo
Pipetas 5 ml.

REACTIVOS

Solución de globulinas de la práctica anterior
Solución de albúmina de la práctica anterior
Muestra de suero o plasma
Solución de gelatina
Agua destilada
Reactivo de Biuret

PROCEDIMIENTO

1. Rotular los tubos de ensayo para cada muestra y el control negativo (H_2O_d).
2. Añadir 0,5 ml de la solución correspondientes.

3. Agregar 2 ml de reactivo de Biuret.
4. Observar si ocurre un cambio de color.

2. DETERMINACIÓN DE ALBUMINA CON VERDE DE BROMOCRESOL

MATERIALES	REACTIVOS
Tubos de ensayo	Solución de globulinas de la práctica anterior
Gradilla para tubos de ensayo	Solución de albúmina de la práctica anterior
Pipetas 5 ml.	Muestra de suero o plasma
	Solución de gelatina
	Agua destilada
	Reactivo de Verde de Bromocresol

PROCEDIMIENTO

1. Rotular los tubos de ensayo para cada muestra y el control negativo.
2. Añadir 0,5 ml de la solución correspondiente.
3. Agregar 2 ml de reactivo de Verde de Bromocresol.
4. Observar si ocurre un cambio de color en ambos tubos.

4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

MATERIALES	REACTIVOS
Micropipeta 10µl-100µl y puntas respectivas	Reactivo de Biuret
Micropipeta 100µl/1000µl y puntas respectivas	Agua destilada
Espectrofotómetro	Solución salina
Tubos de ensayo	Patrón para proteínas totales
Cubetas para espectrofotómetro	Soluciones de proteínas obtenidas en la práctica anterior.
	Muestra de suero o plasma
	Solución de gelatina

PROCEDIMIENTO

1. Rotular 6 tubos como “patrón”, “blanco”, “muestra (1 a 4)”.
2. Llenar los tubos con base en el siguiente cuadro:

	BLANCO DE MUESTRA	PATRÓN	MUESTRAS* (1 a 4)	BLANCO DE REACTIVO
Reactivo Biuret	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	
Agua	10 µL			
Patrón (8g/dl)		10 µL		
Muestra*			10 µL	10 µL
Solución salina				1,0 ml

* Repetir el procedimiento con cada una de las muestras a analizar: Soluciones de proteínas obtenidas en la práctica anterior, la muestra de suero o plasma humano y la solución de gelatina

3. Agite los tubos y déjelos en reposo 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Calibrar el equipo, con el blanco de reactivos, en una longitud de onda de 550 nm.
5. Leer las absorbancias del patrón, de las muestras y anotar el resultado obtenido.
6. Si la absorbancia de las muestras se encuentra por encima de lo recomendado por la casa comercial, proceda a diluirla 1:10 con solución salina
7. Realizar los siguientes cálculos para obtener la concentración de proteínas totales (si tuvo que diluir se tiene que tomar en cuenta al hacer el cálculo):

Absorbancia final de la muestra= Absorbancia de muestra-Blanco de muestra

Concentración de proteínas totales= $\frac{\text{Absorbancia final de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}}$ X Concentración del patrón

BIBLIOGRAFÍA

Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina. Manual de Laboratorio de Bioquímica para Microbiología. Universidad de Costa Rica. 2009.

Quesada Silvia. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007.

Simpson, R.J.; Adams, P.D. y Golemis, E.A. Basic methods in protein purification and analysis. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009.

PRACTICA 5
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA AMILASA

OBJETIVO

Determinar la actividad catalítica de la enzima amilasa.

Las enzimas son proteínas catalizadoras que regulan la rapidez de las reacciones químicas ligadas a procesos biológicos fundamentales para los fenómenos vitales como respiración, crecimiento, digestión, conducción nerviosa, generación de energía, entre otros.

La actividad enzimática se define como *“la cantidad de producto formado o la cantidad de sustrato degradado por unidad de tiempo”*. Dicha actividad se puede ver afectada por factores como **la temperatura, el pH, la concentración de la enzima y la concentración del sustrato**.

Las enzimas tienen una temperatura óptima de actividad, en la que la velocidad de reacción es máxima. Si la temperatura llega a sobrepasar la temperatura óptima, esto puede inactivar a muchas enzimas por rompimiento de los enlaces que estabilizan su estructura; y si aumenta aún más, puede llegar a desnaturalizarlas de forma irreversible. Las bajas temperaturas no desnaturalizan a las enzimas, sino que en estas condiciones la reacción se produce lentamente o se detiene por la disminución de los choques entre la enzima y el sustrato; pero la actividad catalítica reaparece cuando se aumenta la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima.

Los cambios en el pH también afectan la actividad catalítica. La estructura terciaria de las enzimas determina cuál es su sitio catalítico y, por lo tanto, su actividad. Esta estructura está estabilizada por enlaces covalentes y no covalentes. Los cambios en el pH modifican las cargas de los grupos R de los aminoácidos que no son neutros, interfieren en las atracciones electrostáticas y en la estabilidad de la estructura, por lo que afectan su actividad enzimática.

Igualmente, la concentración de la enzima y del sustrato afectan la actividad catalítica. Si una reacción ocurre a una temperatura y pH constantes y hay un exceso de sustrato, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la enzima presente, mientras que a una reacción a la que se añade una concentración de enzima definida, en condiciones físicas (de pH, temperatura, etc) constantes, tendrá una velocidad de reacción proporcional a la cantidad de sustrato, hasta un valor límite (cuando se alcanza la saturación de la enzima).

Cuando se trabaja en el laboratorio con enzimas se debe controlar las condiciones de pH, temperatura, tiempo de reacción, presencia de inhibidores, entre otros; generalmente se utilizan concentraciones crecientes de la enzima o del sustrato, de acuerdo con el diseño del experimento. Para determinar si la reacción ocurrió se requiere de un sistema que indique la aparición del producto, el consumo del sustrato o idealmente ambos. En el caso

de la enzima amilasa se utiliza yodo, que forma un complejo morado-negro con el almidón, que es el sustrato; si no hay evidencia del color, quiere decir que el sustrato ya no está pues ha sido degradado, lo cual se puede confirmar con la prueba de Benedict que permite detectar la presencia de azúcares reductores (el producto de la reacción).

1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMILASA

MATERIALES

Tubos de ensayo
Gradilla para tubos de ensayo
Pipetas 5 ml
Pipetas de 1 ml
Pipeteador

REACTIVOS

Solución de almidón al 1%
Solución de Lugol (20 g de yodo metálico y 40 g de yoduro potásico en un litro de agua destilada)
Preparación comercial de α -amilasa
Solución salina 0,85%

PROCEDIMIENTO

1. Previamente coloque la solución de almidón a incubar a 37°C (o 60° según la enzima utilizada) para que tenga esa temperatura al momento de realizar el montaje.
2. En seis tubos marcados como A, B, C, D, E, F, medir y verter los siguientes reactivos en las siguientes cantidades (mililitros):

Reactivo	A	B	C	D	E	F
Solución de almidón 1% a 37°	5	5	5	5	5	5
Solución salina 0,85%	1	0,9	0,8	0,5	0	0
Enzima α -amilasa*	0	0,1	0,2	0,5	1	0
Saliva	0	0	0	0	0	1**

* Añadirla al mismo tiempo a todos los tubos (de último), hacerlo lo más rápido posible.

** Cantidad aproximada, NO medir.

3. Agitar los tubos hasta homogenizar la mezcla de almidón y amilasa.
4. Incubar por 5 minutos a 37°C contando el tiempo a partir del momento en que se acaba la agitación luego de añadir la enzima.

Comentado [CCC1]: Verificar

5. Después del tiempo de incubación, añadir a cada tubo 1 ml de lugol y observar si aparece el color morado o no.
6. Anotar cuál fue el tubo con menor cantidad de enzima y mayor digestión de almidón.
7. Interpretar según las siguientes instrucciones.
 - HIDRÓLISIS NEGATIVA: Color azul, lila o negro (no se hidrolizó el almidón)
 - HIDRÓLISIS PARCIAL: Color rojizo (se hidrolizó parte del almidón)
 - HIDRÓLISIS POSITIVA: Color amarillo del lugol (se hidrolizó todo el almidón)

2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CON DIFERENTES TIEMPOS DE REACCIÓN

MATERIALES	REACTIVOS
Tubos de ensayo	Solución de almidón al 1%
Prensa para tubos	Solución de lugol
Gradilla para tubos de ensayo	Preparación comercial de α -amilasa
Pipetas 5 ml	Solución salina 0,85%
Pipetas de 1 ml	Reactivo de Benedict
Pipeteador	
Equipamiento para incubación a ebullición (Mechero o Baño María a ebullición)	

PROCEDIMIENTO

1. Preparar seis tubos con 0,5 ml de lugol en cada uno y otros dos tubos con 3 ml de reactivo de Benedict.
2. En un tubo aparte, pipetear 10 ml de almidón e incubarlo por al menos 5 minutos a 37°C para que tenga esa temperatura al momento de iniciar el montaje.
3. Se le agrega el doble de la cantidad de amilasa que se le añadió al tubo que en la práctica anterior tenía la menor cantidad de enzima y digestión “total” de almidón.
4. Mezclar lo más rápido posible.
5. Pipetear, inmediatamente, 1 ml de la dilución de almidón en uno de los tubos con Lugol y otro mililitro en un tubo con reactivo de Benedict.
6. En intervalos de un minuto, ir pipeteando 1 ml de mezcla en los restantes tubos con lugol.

Comentado [CCC2]: Cambié estos volúmenes para “mejorar” la resolución

7. Después de 5 minutos pipetear 1 ml de la mezcla en el segundo tubo con reactivo de Benedict.
8. Calentar los dos tubos con mezcla de almidón, enzima y reactivo de Benedict.
9. Anotar las variaciones de color en los diferentes tubos con lugol y reactivo de Benedict.

BIBLIOGRAFÍA

Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.

Quesada Silvia. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007.

PRÁCTICA 6

PROPIEDADES DE LOS CARBOHIDRATOS

OBJETIVO

Identificar mediante reacciones cualitativas la presencia de grupos funcionales característicos de los carbohidratos

Los carbohidratos son aldehídos o cetonas con varios grupos hidroxilo. Según el número de unidades que los constituyen se clasifican en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos; y de acuerdo con el grupo funcional que tengan pueden ser aldosas (aldehídos) o cetosas (cetonas).

Cuando los monosacáridos se encuentran en solución presentan una estructura cíclica que se forma por el ataque nucleofílico de los electrones del oxígeno del grupo hidroxilo del carbono 5 al carbono 1. Al ocurrir esta interconversión entre la forma abierta y la cíclica, y “abrirse” el grupo OH del carbono 5, los electrones quedan libres y actúan como reductores de compuestos; esta capacidad reductora se aprovecha para detectarlos mediante pruebas cualitativas. Algunos sacáridos, como la sacarosa y la metilglucopiranososa, tienen grupos diferentes al hidroxilo unidos al carbono anomérico, por lo que dan negativa la prueba de azúcares reductores.

Existen varias pruebas que permiten caracterizar muestras con azúcares. La prueba de Molish permite determinar si un analito es carbohidrato o no. La de Seliwanoff ayuda a identificar cetosas; y la de Benedict, azúcares reductores. La prueba de yodo permite evidenciar la presencia o ausencia de almidón.

Estas pruebas están basadas en reacciones características de las moléculas en estudio, por ejemplo, cuando los polisacáridos están en contacto con ácidos que los hidrolizan y deshidratan, los monosacáridos resultantes producen derivados del furfural. El furfural o sus derivados se pueden condensar con fenoles y aminas aromáticas, produciendo un complejo coloreado.

Las determinaciones de azúcares reductores se hacen evaluando si estos pueden reducir el Cu^{2+} del CuSO_4 a Cu^{1+} (en un precipitado de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ o CuO_2).

Por su parte, el yodo forma un complejo coloreado con los polisacáridos por adsorción a sus cadenas. En el caso del almidón, la amilosa (lineal) genera un complejo azul mientras que la amilopectina (ramificación) forma un complejo con un color menos intenso.

Estas pruebas permiten reconocer muestras incógnitas o confirmar la presencia de carbohidratos (polisacáridos o monosacáridos) en una solución.

1. REACCIÓN DE MOLISH

MATERIALES

Tubos de ensayo
Gradilla para tubos de ensayo
Pipeta 2 ml
Pipeteador
Goteros

REACTIVOS

Glucosa
Lactosa
Sacarosa
Almidón
Fructuosa
Agua destilada
Reactivo de Molish
Ácido sulfúrico concentrado

PROCEDIMIENTO

1. Rotular 6 tubos como Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Almidón, Fructosa, y agua.
2. Añadir en cada tubo 1 ml de reactivo que le corresponde.
3. Tome un tubo ya listo de cada uno de los carbohidratos y añada a cada uno 2 gotas del reactivo de Molish.
4. Añada a cada tubo, dejando resbalar por las paredes, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.
5. Observe la formación de un anillo violáceo que se forma en la interfase (prueba +) y anote los resultados para cada carbohidrato.

2. REACCIÓN DE BENEDICT

MATERIALES

Tubos de ensayo
Gradilla para tubos de ensayo
Pipeta 1 ml
Pinzas para tubos
Baño María ebullición

REACTIVOS

Glucosa
Lactosa
Sacarosa
Almidón
Fructuosa
Agua destilada
Reactivo de Benedict

PROCEDIMIENTO

1. Rotular 6 tubos como Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Almidón, Fructosa, y agua.
2. Añadir en cada tubo 0,5 ml del reactivo que le corresponde.

3. Añada a cada tubo 1 ml de solución de Benedict.
4. Sumerja los tubos, simultáneamente en un baño de agua hirviendo.
5. Tome el tiempo en que tarda en aparecer un cambio de color y observe el color que toma cada tubo.
6. Si no hay ningún cambio de color después de 15 minutos, anote la reacción como negativa.
7. Anote los resultados para cada tubo.

3. REACCIÓN DEL ÁCIDO PÍCRICO

MATERIALES	REACTIVOS
Tubos de ensayo	Glucosa
Gradilla para tubos de ensayo	Lactosa
Pinzas para tubos	Sacarosa
Baño María ebullición	Almidón
Pipetas de 1 ml	Fructuosa
Pipeteador	Ácido pícrico
Micropipeta y puntas correspondientes	Carbonato de Sodio al 5%

PROCEDIMIENTO

1. Rotular 6 tubos como Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Almidón, Fructosa y agua.
2. Añadir en cada tubo 1 ml de reactivo que le corresponde.
3. Añada un ml de ácido pícrico a cada uno de los tubos que contienen la solución de los diferentes carbohidratos. Agite y añada 1 ml de carbonato de sodio.
4. Caliente a baño maría, hasta que aparezca un color rojo, prueba (+).
5. Si después de 15-20 minutos no hay cambio de color, considere el resultado negativo.

4. REACCIÓN DE SELIWANOFF

MATERIALES	REACTIVOS
Tubos de ensayo	Glucosa
Gradilla para tubos de ensayo	Lactosa
Pipeta 2 ml	Sacarosa
Goteros	Almidón
Baño María	Fructuosa
Pinzas para tubos	Agua destilada
	Reactivo de Seliwanoff

PROCEDIMIENTO

1. Rotular 6 tubos como Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Almidón, Fructosa y agua.
2. Añadir en cada tubo 1 ml del reactivo que le corresponde.
3. Tome un tubo ya listo de cada carbohidrato y añádale 3 ml del reactivo de Seliwanoff.
4. Coloque los tubos al mismo tiempo en un baño de agua hirviendo y anote el tiempo en que se colorea cada tubo, reacción (+).
5. Anote el color adquirido y el tiempo de coloración. Considere la prueba negativa, si no hay cambio de color, después de 15 minutos.

5. REACCIÓN CON LOS ÁLCALIS

MATERIALES	REACTIVOS
Tubos de ensayo	Glucosa
Gradilla para tubos de ensayo	Lactosa
Pipeta 2 ml	Sacarosa
Goteros	Almidón
Pinzas para tubos	Fructuosa
	Agua destilada
	Carbonato de Sodio al 5%

PROCEDIMIENTO

1. Rotular 6 tubos como Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Almidón, Fructosa y agua.
2. Añadir en cada tubo 1 ml del reactivo que le corresponde.

3. Realice la prueba a cada uno de los carbohidratos, añadiendo a cada tubo 1 ml de carbonato de sodio y caliente hasta ebullición.
4. Si aparece una coloración amarilla considere la prueba (+), de lo contrario, considérela (-).
5. Anote los resultados para cada uno de los carbohidratos ensayados.

BIBLIOGRAFÍA

Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina. Manual de Laboratorio de Bioquímica para Microbiología. Universidad de Costa Rica. 2009.

Quesada Silvia. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007.

PRÁCTICA 7
HIDRÓLISIS QUÍMICA DE CARBOHIDRATOS

OBJETIVO

Hidrolizar polisacáridos mediante métodos físicos y químicos.

Los polisacáridos se forman cuando ocurre una reacción de condensación entre dos moléculas de monosacáridos y se elimina una molécula de agua, originando un enlace glicosídico. En la reacción contraria, cuando se rompe esta unión, se da una hidrólisis y se consume una molécula de agua. La hidrólisis del enlace glicosídico se puede inducir enzimáticamente o con ácidos fuertes que desestabilizan esta unión química.

Estos carbohidratos cumplen funciones importantes en las células, como el almidón y el glucógeno, que son utilizados como reserva energética en células animales y vegetales, respectivamente. Ambos polisacáridos están conformados por unidades de glucosa y a diferencian entre sí por la cantidad (frecuencia) de las ramificaciones. Las uniones α (1 $\rightarrow$ 4) son lineales y las α (1 $\rightarrow$ 6) introducen ramificaciones. El glucógeno tiene más ramificaciones que el almidón.

La celulosa, la quitina y otros polisacáridos más complejos como el peptidoglicano, cumplen funciones estructurales. En el caso de la celulosa, los enlaces que unen las moléculas de glucosa son β (1 $\rightarrow$ 4), que le dan más rigidez e hidrofobicidad a la macromolécula.

1. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

MATERIALES

Erlenmeyer 100 mL
Base para calentar en mechero
Varilla de vidrio
Vidrio de reloj o caja de Petri
Tubo de ensayo
Pipetas de 5 y 1ml
Pinzas para tubo
Calentador

REACTIVOS

Solución de almidón al 2%
HCl concentrado
Lugol
Reactivo de Benedict

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en un erlenmeyer 20 ml de disolución de almidón al 1%.
2. Agregue 20 gotas de HCl concentrado y caliente de modo que hierva suavemente.
3. Agitar continuamente y tomar cada cinco minutos, con una varilla de vidrio, una gota y depositarla sobre un vidrio de reloj.

4. Agregarle una gota de Lugol y anotar el color que se produce.
5. Continuar calentando hasta que ya no se produzca color azul con el yodo, lo cual indica que la hidrólisis se ha completado.
6. Pasar a un tubo de ensayo 1 ml de la disolución hidrolizada que queda en el beaker y verificar la reacción de Benedict, la cual debe dar resultado positivo para comprobar que se realizó la hidrólisis.

2. HIDRÓLISIS DE CELULOSA

MATERIALES

Erlenmeyer 100 ml
 Pipeta 5 ml
 Base para calentar en mechero
 2 tubos de ensayo
 Pinzas para tubos

REACTIVOS

Algodón
 Reactivo de Lucas
 NaOH 20%
 Solución de Lugol
 Reactivo de Benedict

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en un erlenmeyer un trozo de algodón o papel filtro bien desmenuzado.
2. Agregar 3 ml de reactivo de Lucas y calentar durante dos minutos, agitando enérgicamente.
3. Dejar enfriar y neutralizar con NaOH al 20%.
4. Distribuir la solución en dos tubos pequeños y verificar en uno de ellos la reacción con el Lugol y en el otro la reacción de Benedict.
5. Si la hidrólisis no fue completa, repetir el procedimiento calentando durante dos minutos más.

3. BÚSQUEDA DE MACROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE METABOLIZAR CELULOSA

1. Haciendo uso de bases de datos bioinformáticas, realice una búsqueda de microorganismo con la capacidad de secretar o degradar celulosa.
2. Proponga alguna metodología para demostrar la actividad de degradación de celulosa haciendo uso las técnicas empleadas en esta práctica.
3. Proponga un uso potencial de este microorganismo a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007. ❖ Mathews, C.K.; Van Holde, K.E.; Ahern, K.G. Bioquímica. 3ª Ed. España. Pearson Education. 2002.

PRÁCTICA 8

CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA

OBJETIVO

Determinar la concentración de glucosa en muestras biológicas utilizando el método espectrofotométrico de Trinder.

La glucosa: $C_6H_{12}O_6$, es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, es fuente de energía y electrones para la mayoría de los seres vivos conocidos.

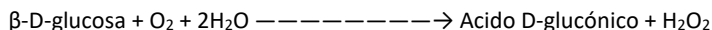
La glucólisis es el proceso mediante el cual las células metabolizan glucosa para obtener energía. En dicho proceso se genera ATP, NADH (agente oxidante en la cadena respiratoria) y piruvato (importante en el ciclo de Krebs de organismos aerobios). Los organismos aerobios pueden obtener 36 ATP a partir de una molécula de glucosa, mientras que los que utilizan metabolismo anaerobio solo obtienen 4 ATP. En organismos superiores como los humanos, esta energía permite que ocurran procesos como la transmisión nerviosa, la contracción muscular, el transporte activo y la producción de sustancias químicas. Algunos tejidos y órganos como el cerebro son más sensibles a los cambios en la glucemia, es decir, a la concentración de glucosa en sangre. Por lo anterior, resulta importante medir la concentración de glucosa en múltiples muestras biológicas, por ejemplo, en alimentos, para su caracterización; en sangre, para monitorear la glicemia, o en orina, para diagnóstico y seguimiento de condiciones metabólicas, entre otras muestras y situaciones.

La cuantificación de glucosa se puede realizar con varios métodos, dos de los más empleados son el método de la O-toluidina y el método enzimático de Trinder.

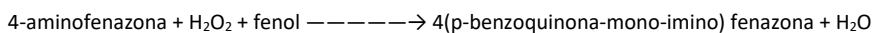
En el método de la O-Toluidina, este reactivo se condensa con el grupo aldehído de la glucosa para formar una base de Schiff coloreada, que tiene su máxima absorción en 630 nm aproximadamente.

En el método enzimático de Trinder se utilizan dos enzimas, la glucosa oxidasa y la peroxidasa, cuyas reacciones se acoplan para obtener un producto coloreado, en que la intensidad del color es proporcional a la cantidad de glucosa.

Glucosa oxidasa



Peroxidasa



El 4(p-benzoquinona-mono-imino) fenazona que resulta al final de las reacciones de las dos enzimas tiene su mayor absorbancia a una longitud de onda de 500-550 nm.

Dentro de las interferencias que tiene el método de Trinder está la presencia de compuestos antioxidantes y oxidantes en concentraciones significativas que pueden llegar a alterar la actividad de la enzima peroxidasa.

El reactivo de glucosa oxidasa que se utiliza en el método enzimático tiene fenol y azida de sodio, por lo que se recomienda evitar el contacto con mucosas y piel.

En esta práctica se determinará cuantitativamente glucosa por el método Trinder, a muestras biológicas que contienen este carbohidrato en cantidades apreciables.

MATERIALES

Balanza
Mortero
Probeta 25 mL
Centrífuga
Tubos de centrífuga 50 ml
Beaker de 100 ml
Espectrofotómetro
Micropipeta 1000 µl
Micropipeta 10 µl
Puntas para micropipetas
Agitador de vidrio
Tubos de ensayo
Cubetas
Equipamiento para incubación a 37°C

REACTIVOS

Kit para determinación de Glucosa
Bananos
Uvas
Muestra de suero o plasma

PROCEDIMIENTO

1. Pesar 10 g de uvas y bananos.
2. Medir 25 ml de agua destilada.
3. Macerar las frutas separadamente.
4. Transvasar cuantitativamente el macerado a un beaker de 100 ml.
5. Agregar los 25 ml de agua destilada al beaker con el macerado.
6. Homogenizar con la varilla de vidrio.

7. Transvasar el material homogenizado a un tubo de centrifuga.
8. Centrifugar cinco minutos a 3000 rpm.
9. Separar cuidadosamente el sobrenadante.
10. Determinar al sobrenadante la concentración de glucosa utilizando el método enzimático de Trinder de acuerdo con el siguiente procedimiento:

a. Rotule 5 tubos como “patrón”, “blanco”, “muestra1”, “muestra2”, “muestra3”.

b. Proceda a llenar los tubos de acuerdo con el siguiente cuadro:

	BLANCO DE REACTIVO	PATRÓN	MUESTRA*
Reactivo enzimático	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Agua	10 µL		
Patrón (100mg/dl)		10 µL	
Muestra			10 µL

* Aplicar el procedimiento a las cada muestra de fruta y de suero o plasma de manera separada.

c. Agite los tubos e incúbelos 5 minutos a 37°C.

d. Lea los tubos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm.

12. Calcule la concentración de glucosa (mg de glucosa/g peso fresco fruta).

*Si la concentración obtenida fuese mayor a 500 mg/dl, se debe diluir 1:10 la solución con agua destilada. Para calcular entonces multiplicar por el factor de dilución.

BIBLIOGRAFÍA

Cátedra de Química Clínica. Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Clínica.
Universidad de Costa Rica. 2000.

PRÁCTICA 9
CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA DE LOS LÍPIDOS

OBJETIVO

Utilizar diferentes métodos químicos para caracterizar ácidos grasos saturados e insaturados.

Los lípidos son una serie de biomoléculas orgánicas compuestas por carbono, hidrógeno y generalmente oxígeno que son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Esto se debe a la presencia de gran cantidad de enlaces C-C y C-H, en grupos alifáticos, aromáticos o alicíclicos.

De acuerdo con su composición, los lípidos se pueden clasificar de varias formas, una de ellas tiene que ver con la presencia de ácidos grasos en lípidos saponificables (poseen ácidos grasos, algunos de ellos son simples como los triacilglicéridos y las ceras, otros son más complejos como los fosfolípidos) y en insaponificables (no poseen ácidos grasos, como por ejemplo los terpenos y los esteroides).

La saponificación se refiere a la formación de una molécula de jabón por la hidrólisis alcalina de una grasa, esto ocurre cuando los ácidos grasos se separan de la molécula a la que están esterificados y forman su sal respectiva. La capacidad de saponificar se determina con el índice de saponificación, que se define como la cantidad de KOH necesaria para saponificar un gramo de muestra. Por otro lado, el índice de acidez se define como los mg de KOH necesarios para neutralizar la acidez libre de un gramo de muestra. Cuando se conoce la fórmula del ácido graso se puede calcular el índice de acidez teórico; pero en el laboratorio se puede determinar por medio de una titulación. Si en lugar de KOH se usa NaOH es necesario efectuar una corrección al calcular el índice de saponificación:

$$I. A = \frac{40 \times N \times V \times 56}{40 \times M} = \frac{56 \times N \times V}{M}$$

Donde:

40 es el peso molecular de NaOH

56 es el peso molecular de KOH

56/40 la relación que permite convertir el peso de NaOH al peso de KOH

V es el volumen en ml de NaOH requerido para la titulación

N es la normalidad del NaOH empleado

M es el peso de la muestra en gramos

Los ácidos grasos, por su lado, pueden clasificarse de acuerdo con su cadena alifática en saturados (que carecen de dobles enlaces) o insaturados (poseen al menos un doble enlace). Los dobles enlaces pueden saturarse si se les adiciona halógenos como el yodo y el bromo. Aprovechando esta propiedad, el índice de yodo permite determinar el grado de insaturación de un ácido graso y se define como la cantidad de yodo en gramos que absorben 100 g de muestra.

1. INDICE DE ACIDEZ

MATERIALES

3 beakers
1 probeta 50 ml
Baño maría
Bureta
Gotero

REACTIVOS

Aceite de soya
Aceite de girasol
Manteca
Etanol neutralizado
NaOH 0,1 N
Fenolftaleína

PROCEDIMIENTO

1. Pesar entre 10 y 15 g de cada grasa en un beaker (la manteca se derrite y se agrega) o un matraz previamente tarado rotulado con la grasa respectiva.
2. Agregar 50 ml de etanol neutralizado.
3. Introduzca el matraz en un baño de agua mantenido a 60 °C y coloque bajo la bureta con NaOH 0,1N.
4. Agregar 10 gotas de disolución de fenolftaleína.
5. Titular, sin dejar de calentar, hasta que la solución con el aceite vire de color.
6. Calcular el índice de acidez, según la fórmula presentada en la introducción.

2. PRUEBA DE INSATURACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

MATERIALES

6 tubos
Micropipetas de 1000uL
Puntas de micropipeta
Goteros
Baño maría

REACTIVOS

Aceite de soya
Aceite de girasol
Aceite de oliva
Mantequilla
Margarina
Manteca

Lugol
Solución de almidón 1%

PROCEDIMIENTO

1. Rotular 6 tubos de ensayo con los nombres de los aceites o grasas a estudiar.
2. Agregar 2 ml del aceite respectivo (la manteca se derrite y se añade).
3. Agregar 3 gotas de lugol a cada tubo y agitar (la mezcla toma el color del yodo).
4. Calentar en baño maría y observar el cambio de color.
5. Tome el tiempo que tarda en desaparecer el color inicial.
6. Deje enfriar y añade 6 gotas de solución de almidón.
7. Observe si hay cambio de color.

BIBLIOGRAFÍA

Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina. Manual de Laboratorio de Bioquímica para Microbiología. Universidad de Costa Rica. 2009.

Quesada Silvia. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007.

PRÁCTICA 10

EXTRACCIÓN DE CEFALINA Y LECITINA

OBJETIVO

Utilizar métodos químicos para separar fosfolípidos.

Los fosfolípidos son lípidos que presentan una estructura compuesta por grupos funcionales, como el alcohol, junto a dos ácidos grasos y un grupo fosfato. Los derivados del glicerol son denominados fosfoglicéridos, y están formados por una molécula de glicerol unida a un grupo fosfato y a dos ácidos grasos (cuyas cadenas miden entre 14 y 24 átomos de carbono). Esta estructura hace que se caractericen por ser bipolares.

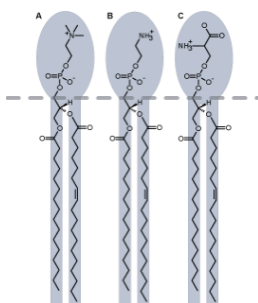


Figura 1 Estructura de la (A) Fosfatidilcolina; (B) fosfatidiletanolamina y (C) fosfatidilserina. Arriba de la parte punteada corresponde a la parte polar de la molécula y debajo de la línea punteada las cadenas no polares.

Todas las membranas plasmáticas cuentan con fosfolípidos en la conformación de sus bicapas. Una fuente rica en lípidos es el huevo, pues constituyen el 33% del peso total de la yema; aproximadamente la cuarta parte de dichas grasas son fosfolípidos y de estos, el 75% corresponde a lecitina y el 20% a cefalina.

La lecitina se produce de manera natural en tejidos animales y vegetales, y es un insumo importante para la industria alimentaria donde se utiliza como agente emulsificante en mayonesas, salsas y otras preparaciones. También es ampliamente utilizada en el campo farmacéutico, para lo que comúnmente se extrae del frijol de soya.

MATERIALES

Probetas
1 beaker
Agitador de vidrio
Papel filtro
Soporte y embudos para filtrar
1 erlenmeyer
Horno
Baño de hielo
Caja de Petri
Balanza (fuera de la sesión)

REACTIVOS

Yema de huevo
Éter de petróleo
Acetona
Etanol frío

PROCEDIMIENTO

1. Colocar la yema de un huevo en un beaker previamente pesado y anote su peso.
2. Agregar 25 ml de éter de petróleo.
3. Homogenizar bien con un agitador de vidrio.
4. Agregar lentamente y sin dejar de agitar 25 ml de acetona.
5. Dejar en reposo 5 minutos.
6. Filtrar utilizando el papel filtro.
7. Lave el precipitado del papel filtro con 5ml de acetona.
8. Coloque el precipitado en un beaker que se encuentra en baño de hielo.
9. Agregar 10 ml de alcohol frío al precipitado.
10. Mezcle con el agitador y filtre con un papel filtro previamente pesado.
11. Recoger el filtrado en un Erlenmeyer pesado previamente.
12. Secar en un horno el precipitado que quedó en el papel filtro (cefalina) y el filtrado que está en el Erlenmeyer (colocar la cefalina en una caja Petri).
13. Una vez que estén secos, pesar los precipitados.
14. Reportar el porcentaje de lecitina y el de cefalina por yema de huevo.

BIBLIOGRAFÍA

Deloya, Alma. Prácticas de Laboratorio para el curso Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007.

Girón-Calle, J.; Pedroche, J.; Rodríguez Patino J.R; Millán F. Proteínas Alimentarias y Coloides de Interés Industrial. 1ª ed. Universidad de Sevilla. 2003.

PRÁCTICA 11
CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

OBJETIVO

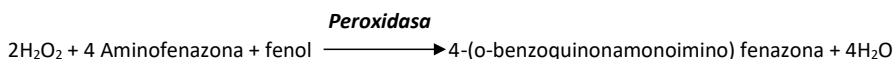
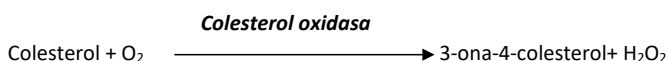
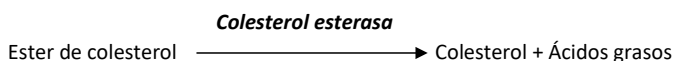
Cuantificar mediante un método espectrofotométrico la concentración de colesterol y triglicéridos en muestras biológicas.

El colesterol es un sólido seroso, insoluble en agua y de color blanco que se encuentran en tejidos y suero de animales. Cumple dos funciones biológicas importantes: forma parte de las membranas biológicas y es un compuesto que sirve de base para la síntesis de las hormonas esteroideas, vitamina D y ácidos biliares.

Esta molécula es insoluble en el suero, para transportarse forma un complejo con las lipoproteínas, que pueden ser de baja densidad (LDL), muy baja densidad (VLDL) y de alta densidad (HDL). Su exceso en suero se relaciona con aterosclerosis.

El colesterol puede obtenerse por dos fuentes: endógena (el mismo organismo lo produce) y exógena (por la dieta).

Existen varias metodologías para la determinación de colesterol. Actualmente la más usada es el método enzimático de Trinder, en el que el colesterol esterificado es hidrolizado por la enzima colesterol esterasa, obteniéndose colesterol libre, que a su vez es oxidado por la enzima colesterol oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno que después se acopla a la reacción de Trinder, catalizada por la enzima peroxidasa.



Los triglicéridos están constituidos por una molécula de glicerol y tres cadenas de ácidos grasos. En los animales superiores pueden ser sintetizados (fuente endógena) o ingeridos como parte de la dieta (fuente exógena), y constituyen el 95% del tejido adiposo. El método enzimático de Trinder también se emplea en la determinación de los triglicéridos.

Lipasa

Triglicéridos $\longrightarrow$ Glicerol + Ácidos grasos

Glicerol + ATP $\xrightarrow{\text{Glicerol kinasa}}$ Glicerol-3- fosfato +ADP

Glicerol-3-fosfato + O₂ $\xrightarrow{\text{Glicerol fosfatasa}}$ DHA-fosfato + H₂O₂

2H₂O₂ + 4 Aminofenazona + fenol $\xrightarrow{\text{Peroxidasa}}$ 4-(o-benzoquinonamonoimino) fenazona + 4H₂O

MATERIALES

Beaker
Pipeta
Pipeteador
Micropipeta 10μl-100μl
Micropipeta 100μl/1000μl
Puntas para micropipeta
Tubos
Espectrofotómetro
Cubetas para espectrofotómetro
Equipamiento para incubación a 37°C (Baño
María a 37°C o incubadora)

REACTIVOS

Reactivo enzimático para la determinación de
colesterol
Reactivo enzimático para la determinación de
triglicéridos
Agua destilada
Patrón para colesterol
Patrón para triglicéridos
Yema de huevo
Etanol
Muestra de suero o plasma

PROCEDIMIENTO PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Separe una yema de huevo del resto de la clara.
2. Colóquela en un beaker de 50 o 100 ml.
3. Agréguele 25 ml de etanol.
4. Homogenice la mezcla.

1. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL POR MÉTODO ENZIMÁTICO

1. Rotule 4 tubos como “patrón”, “blanco”, “muestra 1” y “muestra 2”.
2. Proceda a llenar los tubos de acuerdo con el siguiente cuadro:

	BLANCO DE REACTIVO	PATRÓN	MUESTRA*
Reactivo	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Agua	10 µL		
Patrón (100mg/dl)		10 µL	
Muestra*			10 µL

* Aplicar el procedimiento a la muestra de yema de huevo y de suero o plasma humano de manera separada

3. Agite los tubos e incúbelos 5 minutos a 37°C.
4. Lea los tubos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm.
5. Calcule la concentración de colesterol en mg/dl. Si se encuentra por encima de la concentración máxima recomendada por la casa comercial proceda a diluir 1:10 con agua

2. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS POR MÉTODO ENZIMÁTICO

1. Rotule 4 tubos como “patrón”, “blanco”, “muestra 1” y “muestra 2”.
2. Proceda a llenar los tubos de acuerdo con el siguiente cuadro:

	BLANCO DE REACTIVO	PATRÓN	MUESTRA*
Reactivo	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Agua	10 µL		
Patrón (200mg/dl)		10 µL	
Muestra			10 µL

* Aplicar el procedimiento a la muestra de yema de huevo y de suero o plasma humano de manera separada

3. Agite los tubos e incúbelos 5 minutos a 37°C.
4. Lea los tubos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm.
5. Calcule la concentración de triglicéridos presente en la yema de huevo y la muestra humana. Si se encuentra por encima de la concentración máxima recomendada por la casa comercial proceda a diluir 1:10 con agua

BIBLIOGRAFÍA

Cátedra de Química Clínica. Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Clínica. Universidad de Costa Rica. 2000.